



Ministério da Educação
Universidade Federal de São Paulo
Campus Baixada Santista
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA



Beatriz da Silva Peres

*Comparação dos efeitos do laser terapêutico 808 nm,
utilizado em diferentes fluências, na regeneração do
músculo tibial anterior após criolesão em ratos.*

**SANTOS
2010**

Beatriz da Silva Peres

***Comparação dos efeitos do laser terapêutico 808 nm,
utilizado em diferentes fluências, na regeneração do
músculo tibial anterior após criolesão em ratos.***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de São Paulo, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Bacharel em
Fisioterapia.

Orientadora: Ana Cláudia Muniz Rennó

Apoio FAPESP 2009/07396-1

CEP: 0091/09

Santos

2010

Ficha Catalográfica

Peres, Beatriz da Silva

Comparação dos efeitos do laser terapêutico 808nm, utilizado em diferentes fluências na regeneração do músculo tibial anterior após criolesão em ratos/Beatriz da Silva Peres – – Santos, 2010
37f

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - Campus Baixada Santista, 2010

Curso: Fisioterapia

Orientador: Ana Cláudia Muniz Rennó

1. Lesão Muscular. 2. Regeneração Muscular. 3. Laser Terapêutico de baixa potência I. Ana Cláudia Muniz Renno II. Comparação dos efeitos do laser terapêutico 808nm, utilizado em diferentes fluências na regeneração do músculo tibial anterior após criolesão em ratos. III. Santos - Campus Baixada Santista.

CDD 615.82

Ficha catalográfica - Biblioteca - UNIFESP, Campus Baixada Santista.

Beatriz da Silva Peres

***Comparação dos efeitos do laser terapêutico 808nm,
utilizado em diferentes fluências na regeneração do músculo
tibial anterior após criolesão em ratos.***

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de São Paulo,
como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Fisioterapia.**

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Ana Claudia Muniz Rennó

Julgamento: _____

Instituição: UNIFESP

Assinatura: _____

Prof. Dr^ª. Carla Cristina Medalha

Julgamento: _____

Instituição: UNIFESP

Assinatura: _____

Prof^ª. Dr^ª. Liu Chiao Yi

Julgamento: _____

Instituição: UNIFESP

Assinatura: _____

Dedicatória

À minha família, por todo apoio, presença e dedicação, agora e em todas as etapas da minha vida.

Agradecimentos

À minha orientadora, Ana Cláudia Muniz Renno, por toda dedicação e aprendizado. Sem os quais, este projeto não teria sido realizado de forma gratificante.

À amiga, Renata Luri Toma, por todo aprendizado, confiança e colaboração, indispensáveis à realização deste trabalho.

À amiga, Giuliana Castro Di Gangi, por toda ajuda e companheirismo durante este último ano de graduação, principalmente nos laboratórios.

Ao Laboratório Multidisciplinar, do departamento de Biociências da UNIFESP.

Ao Laboratório de Eletrotermofototerapia da Universidade Federal de São Carlos.

À todos aqueles que de forma direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho.

Resumo

Traumas no tecido muscular são condições clínicas comumente encontradas na área esportiva e ortopédica. Os danos no músculo esquelético frequentemente levam à necrose e degeneração das fibras musculares. Dentro deste contexto, muitas terapias vêm sendo pesquisadas com o intuito de acelerar a regeneração muscular, dentre estas se destaca a terapia laser de baixa potência. Resultados anteriores demonstraram que o laser de baixa potência (LLLT) promove diminuição do processo inflamatório e aumento da proliferação celular, resultando em aceleração da regeneração muscular pós-lesão. No entanto, apesar da série de evidências da efetividade do LLLT no processo de regeneração muscular, os mecanismos envolvidos nestes eventos são amplamente desconhecidos, e ainda há uma contradição entre os diversos parâmetros usados. Com isso, este projeto teve como objetivo analisar os efeitos do LLLT na regeneração do músculo tibial anterior em ratos após criolesão. Para isso, foram utilizados ratos Wistar machos, divididos nos seguintes grupos: grupo controle lesão muscular (submetidos à lesão sem tratamento); grupo lesão muscular tratado com LLLT na fluência de 10J/cm²; grupo lesão muscular tratado com LLLT na fluência de 50J/cm². Todos os grupos foram sub-divididos em 2 sub-grupos, com tempos diferentes de eutanásia após a lesão. Assim formaram-se os subgrupos A (constituído por animais que serão submetidos a 3 sessões de tratamento) e B (constituído por animais que serão submetidos a 6 sessões de tratamento). Os protocolos de tratamento com LLLT se iniciaram-se 24 horas após a realização do procedimento cirúrgico, e as sessões de tratamento com intervalos de 48 horas. Após a eutanásia dos animais, os músculos foram retirados e processados para a análise histológica. Após a retirada de um fragmento do ventre do músculo tibial anterior, este foi fixado, desidratado e incluído em parafina e submetido a procedimento padrão para a confecção das lâminas histológicas. Em seguida, o material foi corado com Hematoloxilina e Eosina (HE), para análise qualitativa e com Picrossirius Red, para a avaliação da concentração de colágeno, através de um software de imagens. Além disso, também foi realizada a avaliação imunohistoquímica, com objetivo de verificar a expressão do fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e COX -2. As variáveis obtidas foram avaliadas pela comparação entre os resultados obtidos nos músculos dos animais dos diferentes grupos experimentais e foram analisados estatisticamente (teste ANOVA). Os valores foram considerados significativos quando $p \geq 0.05$. Os resultados obtidos demonstram a eficácia da terapia laser nas fluências 10 e 50J/cm², em que foi possível observar diminuição da área de necrose, maior concentração de infiltrado celular, diminuição da deposição de fibras colágenas e maior expressão de COX2. Todavia, são necessários mais estudos neste campo para estabelecer os parâmetros adequados na utilização da terapia laser.

Palavras-Chaves: tecido muscular, lesão muscular, criolesão, regeneração muscular, laser terapêutico de baixa potência.

Abstract

Muscle injuries are usual clinical conditions found in the orthopedic and sports areas. Damage in skeletal muscle frequently leads to necrosis and muscles fibers degeneration. Previous results have shown that low level laser therapy (LLLT) promotes a decrease in the inflammatory process and an increase in cells proliferation, resulting in the acceleration of the muscle regeneration after injury. The objective of this work was to analyze the effects of different LLLT fluencies over the regeneration of the anterior tibial muscle after cryolesion. Wistar male rats were divided into three groups: injured muscle control group; injured muscle group treated with LLLT at $10\text{J}/\text{cm}^2$ and injured muscle group treated with LLLT at $50\text{J}/\text{cm}^2$. This groups was divided into two sub-groups: tree submitted session of treatment; and six session of treatment. The treatment protocol with LLLT started 24 hours after surgical procedure and was constituted of 3 or 6 sessions of treatment with 48 hours intervals. After the euthanasia of rats, a muscle fragment from each animal was removed, fixed, dehydrated and inserted into paraffin to obtain histological slides. The material was colored with Hematoxylin and Eosin (HE) and Picrosirius Red, for qualitative analysis of the necrosis extension, disorganization of the muscular tissue, and inflammatory cell presence; and evaluation of collagen concentration, respectively. In addition, imunohistochemical evaluation was performed, to observe the expression of VEGF and COX-2. As results, in the lesion group treated with LLLT, it was observed reduction of necrosis area, higher concentration of cellular infiltration, reduced collagen deposition and increase expression of COX-2. The conclusion is that the treatment with LLLT in 10 and $50\text{J}/\text{cm}^2$ was effective for the regeneration of muscle injury. However, further studies are needed in this field to establish the appropriate parameters in the use of laser therapy.

Key words: muscle injury, cryolesion, low level laser therapy.

Sumário

1. Introdução	8
2. Objetivo	12
3. Material e Métodos	12
3.1. Animais	12
3.2. Lesão	13
3.3. Grupos experimentais	13
3.4. Eutanásia	16
3.5.1. Análises	16
3.5.2. HE	16
3.5.3. Colágeno	17
3.5.4. Imunohistoquímica	18
3.5.5. Análise estatística	19
4. Resultados	19
4.1. Histopatológicos	19
4.2. Fibras colágenas	22
4.3. Imunohistoquímica	23
5. Discussão	25
6. Conclusão	29
Referências bibliográficas	30

1. Introdução

1.1. Lesão Muscular

O tecido muscular é um dos tecidos mais freqüentemente afetados por lesões, seja durante atividades esportivas, seja durante as atividades de trabalho. Estas acontecem por diversos mecanismos, como trauma direto, tensão elevada e deformação ou devido à prática excessiva de exercícios (overuse) (RANTANEN et al., 1999; PRENTICE, 2002).

A lesão muscular apresenta inicialmente a degeneração da fibra muscular, caracterizada pela desorganização e dissolução das unidades sarcoméricas, sarcossoma, retículo sarcoplasmático e mionúcleo (WERNING *et al.*, 1991). As alterações ultraestruturais mais freqüentes neste tipo de lesão são as alterações na membrana plasmática, desorganização dos miofilamentos e rompimento de linha Z (HORTOBÁGYI *et al.*, 2000; RILEY *et al.*, 1995). Os processos subseqüentes a esses eventos catabólicos levam à regeneração e reparo da fibra.

Após o processo lesivo, instala-se o processo de reparo no qual o tecido muscular originalmente lesado é substituído e há formação de cicatriz (JARVINEN et al, 2007). O processo de cicatrização é dado como uma resposta biológica frente à lesão tecidual e pode ser descrito pelo movimento e sinalização de células especializadas até o local da lesão, para que outras células possam ter acesso ao mesmo local (RIBEIRO, 2009). Assim, pelo menos duas populações de células respondem à injúria muscular: células inflamatórias envolvidas na remoção de restos celulares e células miogênicas envolvidas na reposição da fibra danificada (HORTOBÁGYI *et al.*, 2000).

O reparo do tecido muscular inicia-se logo após a lesão. A ruptura das fibras e necrose tecidual levam ao acionamento do processo fagocitário. Este consiste na remoção do tecido danificado e eliminação de microorganismos na área da lesão (JARVIEN et al, 2005 e 2007; RIBEIRO, 2009). A fagocitose das fibras lesadas é importante para a regeneração efetiva do músculo. A remoção do músculo necrosado é resultado, principalmente, da fagocitose por macrófagos. As células satélites, presentes abaixo da lâmina basal, sobrevivem ao evento traumático inicial e resistem ao ambiente deletério. Após a remoção dos componentes celulares da fibra muscular lesada, as células satélites são ativadas, dando origem a uma população de mioblastos, os quais vão se fundir, formando miotúbulos multinucleados, com núcleo central, os quais se diferenciam em fibras musculares maduras, com núcleo periférico. A integridade da lâmina basal é importante para o sucesso da regeneração e sua presença minimiza a formação de fibrose (MIYABARA et al, 2005).

Ainda, há também a proliferação de componentes vasculares no local da lesão, além da migração de fibroblastos, responsáveis pela deposição de fibras de colágeno (JARVINEN et al, 2007; RIBEIRO, 2009).

Outro componente envolvido no processo de reparo do tecido muscular é a matriz metaloproteinase (MMPs). Estas enzimas digestivas fazem parte do processo de formação, remodelação e degradação da matriz extracelular, mantendo a integridade funcional das fibras. Por participar do processo de migração, diferenciação e regeneração muscular, as MMPs estão diretamente relacionadas com a ativação, migração para o local da lesão e diferenciação das células satélites (CHEN e LI, 2009). Durante o processo de reparo muscular, as MMPs apresentam padrão distinto de expressão. Há descrito na literatura que algumas enzimas específicas participam ativamente do processo nos primeiros 3 dias após a lesão no músculo tibial anterior enquanto outras atuam até o 10º dia pós lesão (FERRE et al, 2007). Assim, algumas enzimas estão envolvidas com os estágios iniciais do processo inflamatório e ativação de células satélites, enquanto outras estão envolvidas com os estágios finais do processo regenerativo. Estas enzimas podem ainda reduzir a formação de cicatriz fibrosa no tecido muscular durante o processo de reparo, pois digerem as fibras colágenas da membrana basal (CHEN e LI, 2009; FERRE et al, 2007).

A revascularização é um evento importante para a formação de novas fibras musculares. Aproximadamente 3 a 7 semanas da lesão, a perfusão do tecido muscular já encontra-se normal, graças à ação da VEGF, que promove a neoangiogênese na área lesada, revertendo o processo isquêmico instalado e evitando a extensão da necrose por hipoxemia (BORSELLI et al, 2009).

Com isso pode ser observado que o processo de reparo muscular é dependente de vários fatores e no decorrer desse podem ocorrer alguns eventos que irão culminar na regeneração inadequada da lesão muscular, levando à redução da funcionalidade e rendimento para o treino, principalmente no caso de atletas, e ainda resultando em tendência à recorrência de novas lesões (VERRAL et al.2001; ORCHARD e BEST, 2002).

Dentro deste contexto, diversas técnicas vêm sendo propostas na tentativa de diminuir o tempo de regeneração tecidual e de potencializar a eficiência do processo regenerativo, visando à recuperação do paciente e seu retorno precoce às atividades, principalmente em casos de atletas. Dentre estas, o laser terapêutico de baixa potência (LLLT) vem tendo um papel de destaque na tentativa de acelerar o processo de regeneração tecidual após um trauma (HADJIARGYROU et al, 1998).

1.2. Laser terapêutico de baixa potência (LLLT)

O laser terapêutico de baixa intensidade (LLLT) é um recurso terapêutico que vem demonstrando efeitos positivos no processo de regeneração tecidual após um trauma (KARU, 1998). O LLLT tem sido utilizado, desde 1960, com fins terapêuticos, como um tratamento seguro e efetivo para uma série de condições patológicas nos mais diversos tecidos (BASFORD, 1989). Basicamente, o LLLT auxilia o processo de reparo a partir da proliferação de fibroblastos; aumento de fibras colágenas e elásticas; angiogênese; ativação, migração e diferenciação de células satélites (IYOMASA, 2009).

Dentre os principais efeitos do LLLT nos tecidos podemos citar:

Efeitos anti-inflamatórios: o LLLT inibe o processo inflamatório através da inibição de fatores quimiotáticos nas primeiras etapas da lesão, da interferência nos efeitos dos mediadores químicos e da diminuição do volume de exsudado, alterando a permeabilidade vascular (KARU, 1998).

Efeito analgésico: relacionado provavelmente ao relaxamento muscular e aos mecanismos opióides endógenos. O laser atua na redução da inflamação e da dor pela promoção da reabsorção de exsudatos, favorecendo assim a eliminação de substâncias algogênicas. Além disso, essa irradiação elevaria o limiar de dor nos nervos periféricos, interferindo assim na transmissão do estímulo nervoso, fato este evidenciado por demais autores (Yaakobi et al, 1996).

Efeito cicatrizante (trófico-regenerativo): promovendo a proliferação celular.

Esses efeitos vêm sendo comprovados em diversos estudos, que afirmam que o LLLT promove um aumento da síntese de DNA e da proliferação celular em culturas de fibroblastos, condrócitos e osteoblastos. Foi observado também que o LLLT pode promover a reabsorção de exsudatos, a síntese e remodelação de colágeno, o aumento do número de fibroblastos, aumento da viabilidade dos enxertos, aumento da vascularização (RIGAU, 1996), aceleração da regeneração nervosa e da cicatrização tecidual (OZAWA et al, 1998).

Rigau (1996) e Young et al. (1989) demonstraram que o LLLT promove estimulação dos macrófagos e leva à liberação de fatores que atuam na proliferação de fibroblastos acima dos níveis controle. Além disso, a presença de oxigênio, que é de suma importância na etapa de proliferação e maturação fibroblástica, pode ser incrementado pela ação do laser com ação positiva deste no aumento da microcirculação.

Diversos trabalhos demonstram que o LLLT é capaz de estimular a regeneração do tecido muscular após uma lesão. De acordo com Amaral et al (2001), o laser HeNe foi capaz de acelerar o processo de regeneração muscular e encontraram uma maior densidade de mitocôndrias. Estes resultados, concordam com os encontrados por Bibikova et al (1994) e Bibikova e Oron (1995), que também observaram aceleração na regeneração muscular após irradiação com laser HeNe, com um aumento significativo de miotúbulos e miofibrilas.

Iyamosa et al (2009) em estudo comparativo com 2 doses de laser He Ne (5 e 10J/cm²), irradiado por 7 dias consecutivos, no processo de regeneração do músculo tibial anterior, observaram que houve dilatação das estruturas celulares, como o retículo endoplasmático e as mitocôndrias, quando comparadas com o grupo não irradiado. Esses achados sugerem melhor processo de reparo, normalizando as funções celulares.

Análises *in vitro* também mostraram que o LLLT promove um aumento da proliferação dos mioblastos e estimula a formação de fibras musculares (AMARAL et al, 2001). Ainda foi demonstrado que a irradiação laser aumenta a expressão de proteínas ligadas à proliferação de células musculares bem como de células satélites (WEISS et al, 1992).

Esses achados corroboram com os encontrados por Luz et al (2007). Esses autores observaram que o laser AsGaAl aumentou a deposição de fibras colágenas após lesão induzida no tecido muscular de ratos, além de levar a um melhor rearranjo arquitetural das fibras musculares e disposição de colágeno entre essas.

Sene (2005) relata um aumento das propriedades mecânicas de carga e alongamento máximo de músculos tratados com laser AlGaInP. Estudo realizado por Roxanna et al. (2007) analisaram os efeitos de diferentes fluências do laser As-Ga (0,8, 2 e 5 J/cm²) no músculo tibial anterior íntegro, constatando que a área das fibras musculares foi significativamente maior nos músculos irradiados do que nos grupos controle não tratados.

Nosso grupo de pesquisa realizou um estudo que comparou os efeitos do LLLT e do ultra-som de baixa intensidade (US) no processo de regeneração muscular após a criolesão em ratos. Foi observado que ambas as terapias foram eficazes para acelerar o processo de regeneração tecidual, sendo que o laser foi mais efetivo em promover o recrutamento de células polimorfonucleares no local correspondente à área da lesão e em determinar um estágio mais avançado do processo inflamatório se comparado ao grupo controle-lesão e ao grupo tratado com US (TOMA et al, 2008 unpublished data).

De acordo com os estudos citados acima, diferentes doses e tipos de laser são usados com objetivo de avaliar a ação terapêutica do laser no tecido muscular. No entanto, por ser de uma tecnologia muito recente, a laserterapia necessita de melhor parametrização das variáveis para

se obter os estímulos mais apropriados, pois muitos dos reais efeitos e limitações ainda não estão totalmente claros e há muita controvérsia sobre seu mecanismo de ação sobre os tecidos (ORTIZ, 2001; KITCHEN & BAZIN, 1996). Além disso, muitas pesquisas produzidas não têm validade científica pela baixa confiabilidade dos dados devido a problemas metodológicos (BAXTER, 1997). Entretanto, excelentes estudos abrem horizontes para esse campo, que no futuro levarão o indivíduo acometido por uma lesão muscular a um retorno mais rápido às suas funções normais (BAXTER, 1994; KITCHEN & BAZIN, 1991), evitando as consequências de uma imobilização prolongada, como a perda de massa muscular, aderências, diminuição ângulos articulares e alterações proprioceptivas.

2. Objetivos

Este projeto teve como objetivo analisar os efeitos do laser terapêutico de baixa potência 808nm, utilizado em 2 fluências (10 e 50J/cm²), no processo de regeneração do músculo tibial anterior em ratos submetidos à criolesão, em diferentes períodos de tempo, durante 6 e 12 dias.

3. Material e Métodos

Este trabalho foi realizado no Laboratório Multidisciplinar, do departamento de Biociências da UNIFESP, campus Baixada Santista, em associação com o Laboratório de Eletrotermofototerapia do departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos.

3.1. Animais Experimentais

Foram utilizados 60 ratos machos da linhagem Wistar, com três meses de idade e com peso corporal entre 250 e 300 gramas no início do experimento, provenientes do biotério central da UNIFESP. Os animais foram mantidos no biotério deste departamento, alimentados com ração comercial e água a vontade, mantidos em regime de luz (12 horas claro e 12 horas escuro) e temperatura controlada em $22 \pm 2^{\circ}$ C. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo (CEP 0091/09).

Para a realização do procedimento experimental, todos os animais foram tricotomizados e submetidos à realização da lesão do músculo tibial anterior. As lesões foram

realizadas de acordo com os princípios éticos de instrumentação animal, sob condições padrão de assepsia e anestesia geral.

3.2. Modelo experimental para a realização de lesão muscular

Este estudo utilizou a técnica de criolesão (Wernig et al, 1991), que consiste na realização de uma incisão lateral no membro posterior esquerdo a fim de expor a superfície do músculo tibial anterior, sendo necessário também, o afastamento da fáscia que o recobre. Em seguida foi introduzida uma barra de ferro (0,4 x 1 cm) previamente imersa em nitrogênio líquido por 10 minutos, em contato com o ventre do músculo, durante 10 segundos (duas vezes). Após a criolesão, a pele foi suturada com monofilamento de poliamida (6-0), e foi feito curativo com álcool iodado. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina e xilasina (20 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente) antes do procedimento.

3.3. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos:

- **Grupo controle lesão muscular (n=20):** animais submetidos ao procedimento de lesão, mas submetidos a nenhum tipo de tratamento.
- **Grupo lesão muscular com terapia laser de 10J/cm² (n=20):** animais submetidos ao procedimento de lesão e tratados com terapia laser 808 nm, com fluência de 10J/cm².
- **Grupo lesão muscular com terapia laser de 50J/cm² (n=20):** animais submetidos ao procedimento de lesão e tratados com laser 808 nm, na fluência de 50J/cm².

Todos os grupos foram ainda divididos em 2 subgrupos: A e B (compostos por 10 animais cada) para a realização das análises em diferentes datas de sacrifício. O subgrupo A sofreu sacrifício no 7º dia pós-cirurgia (3 sessões de tratamento) e o subgrupo B, no 13º dia pós-cirurgia (6 sessões de tratamento), conforme sintetizado na Figura 1.

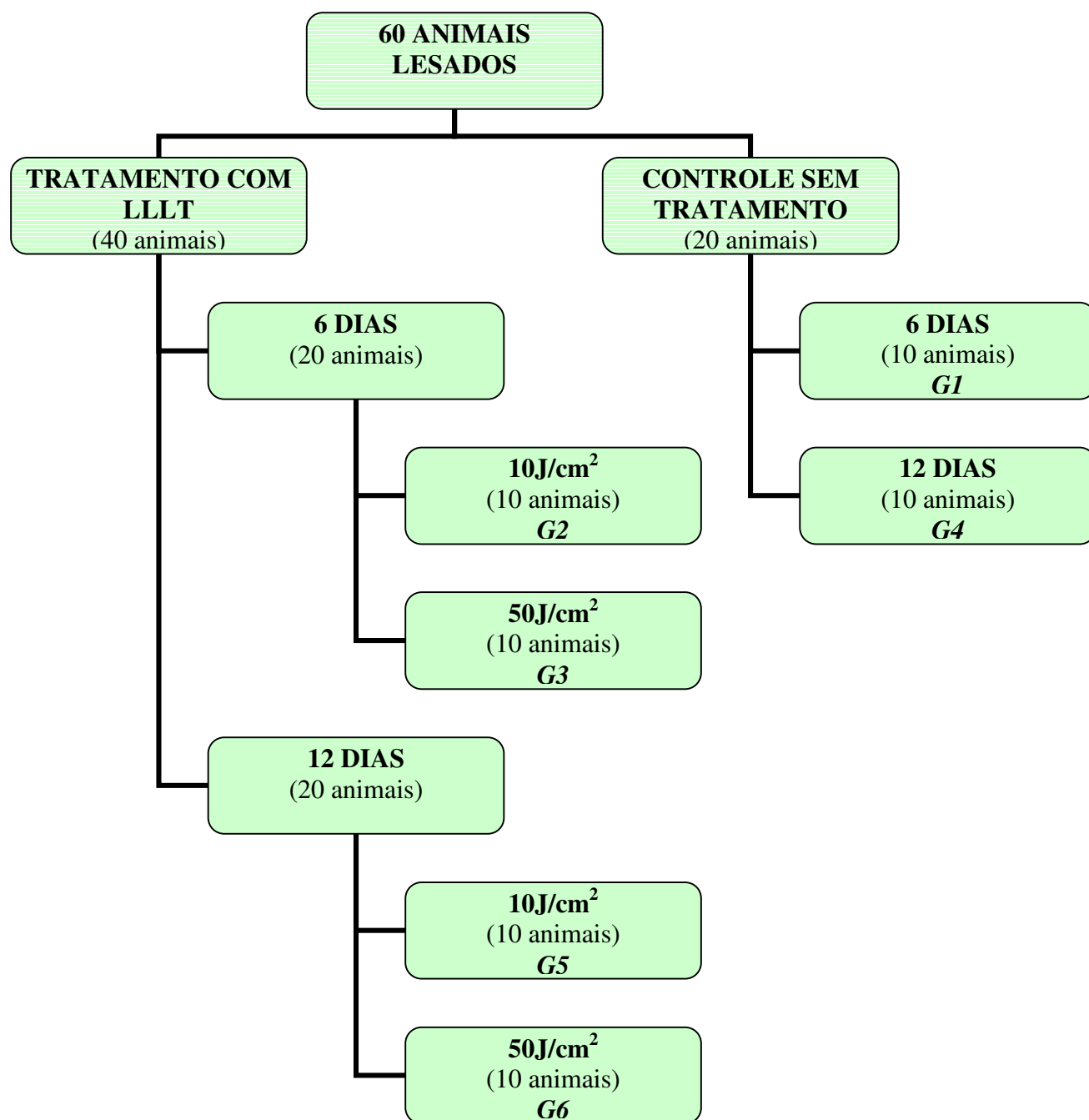


Figura 1: Mapa geral de distribuição dos grupos experimentais.

Vinte quatro horas após os procedimentos de indução de lesão muscular, os animais dos grupos tratados receberam irradiação com laser terapêutico de baixa potência (equipamento DMC Photon Lase III, classe 3B, com diodo de Al-Ga-As), comprimento de onda de 808 nm, emissão contínua, potência de saída de 30 mW, densidade de potência de

50W/cm², diâmetro do feixe de 0,6 mm, divergência de 1.5°, nas fluências de 10J/cm² por 5s, e 50J/cm² durante 28s (Figura 2).



Figura 2: Aparelho portátil para LLLT.

Os protocolos de tratamento foram iniciados 24 horas após o procedimento cirúrgico de lesão e foram realizados a cada 48 horas. A aplicação terapêutica foi feita pontualmente na área correspondente à região da lesão, de forma perpendicular ao tecido, como mostra a Figura 3.

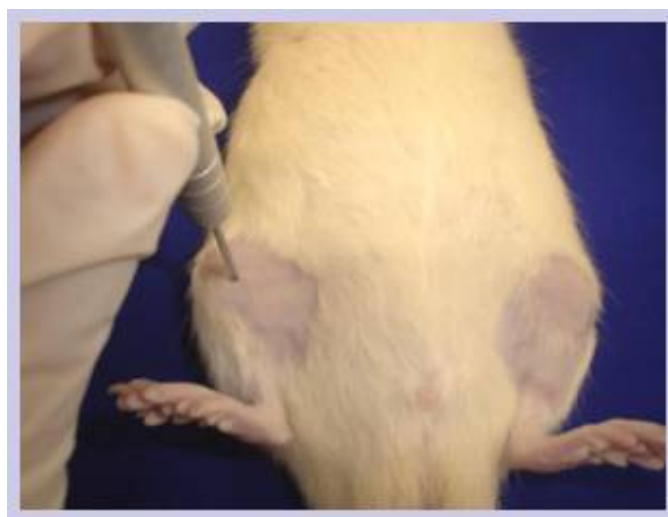


Figura 3: Modelo de tratamento com LLLT.

3.4. Eutanásia dos animais e retirada dos músculos

A eutanásia dos animais ocorreu 24 horas após a última sessão de tratamento. Os animais de todos os grupos foram anestesiados para a retirada do músculo tibial anterior. Em seguida, e ainda sob efeito anestésico, sofreram eutanásia com injeção intracardíaca de KCL 3M. Após retirado, o músculo foi mantido por 24 horas em formalina 10%, em seguida lavado em água corrente com intervalo de 3 horas, por 24 horas, e então mantido em álcool 70%. As análises foram realizadas no laboratório Multidisciplinar, do departamento de Biociências da UNIFESP, campus Baixada Santista, e no laboratório de Eletrotermofototerapia do departamento de Fisioterapia da UFSCAR.

3.5.1. Confeção das lâminas

Após retirados do álcool 70%, os músculos foram cortados de forma que apenas a área da lesão e sua borda foram selecionadas. Em seguida, este fragmento muscular foi ainda dividido transversalmente em 2 partes, e submetido ao procedimento padrão para inclusão em blocos de parafina para posterior corte e confecção de lâminas histológicas (4µm de espessura). Foram confeccionadas 4 lâminas histológicas de cada amostra, sendo uma delas corada com Hematoxilina e Eosina (HE), outra corada com Picrosirius Red, e duas lâminas foram utilizadas para análise imunohistoquímica.

3.5.2 . Analise histológica descritiva

Para esta análise foram utilizadas as lâminas coradas com HE, através das quais foi possível avaliar os efeitos de regeneração muscular após tratamento com LLLT nos diferentes fluências e períodos. Para isso, levou-se em consideração os seguintes critérios: área de necrose, presença de infiltrado inflamatório e organização das fibras musculares. A avaliação foi “cega” e através de um microscópio óptico da marca Leica.

A fim de mensurar as alterações morfológicas observadas, foi utilizada uma análise semi-quantitativa, baseada na classificação estabelecida por Acikel et. al. (2005) e Bertinchant et. al. (2000) modificada. A tabela utilizada gradua as alterações encontradas no processo de regeneração em três níveis: **A** – alterações leves; **B** – alterações moderadas; e **C** – alterações graves. De acordo com os critérios já descritos, essa classificação levou em consideração as seguintes alterações: (+) *brandas*, onde é possível observar danos focais nas células e pequenas degenerações multifocais, e ainda elevada concentração de infiltrado celular; (++)

moderadas, onde há área de degeneração multifocal, moderada extensão de necrose, e média concentração de infiltrado celular; e (+++) *graves*, apresentando extensa área de degeneração e necrose, e baixa concentração de infiltrado celular (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação morfológica segundo Acikel (2005) e Bertinchant (2000)
(modificada)

Alterações	Classificação
<p>(+) <i>brandas</i></p> <p>Danos focais nas células; Pequenas degenerações multifocais; Elevada concentração de infiltrado celular.</p>	A – alterações leves
<p>(++) <i>moderadas</i></p> <p>Área de degeneração multifocal; Moderada extensão de necrose; Média concentração de infiltrado celular.</p>	B – alterações moderadas
<p>(+++) <i>graves</i></p> <p>Extensa área de degeneração e necrose; Baixa concentração de infiltrado celular.</p>	C – alterações graves

3.5.3. Análise de colágeno

Para observação e mensuração das fibras de colágeno, os cortes histológicos corados pelo método do *Picrosirius-red* foram analisados em um microscópio de luz polarizada (Leica).

Para a realização da análise quantitativa foi utilizado o *software* ImageJ, em que é possível quantificar a intensidade do brilho de birrefringência calculando a intensidade do

brilho dado pelo *Picrosirius-red* sob luz polarizada. Essa intensidade é proporcional à organização das fibras colágenas. As fibras colágenas mais espessas e fortemente birrefringentes apresentam-se coradas em tons de laranja a vermelho (Figura 4). Foram avaliados todos os campos na região da lesão, em aumento de 100X, possibilitando assim, a análise de todo o foco de lesão. Dessa forma, a análise da quantidade de deposição de colágeno no tecido foi realizada pela contagem computadorizada, em pixels, e os valores correspondentes a cada campo foram somados, resultando no valor total de birrefringência das fibras colágenas da área lesada em cada animal.

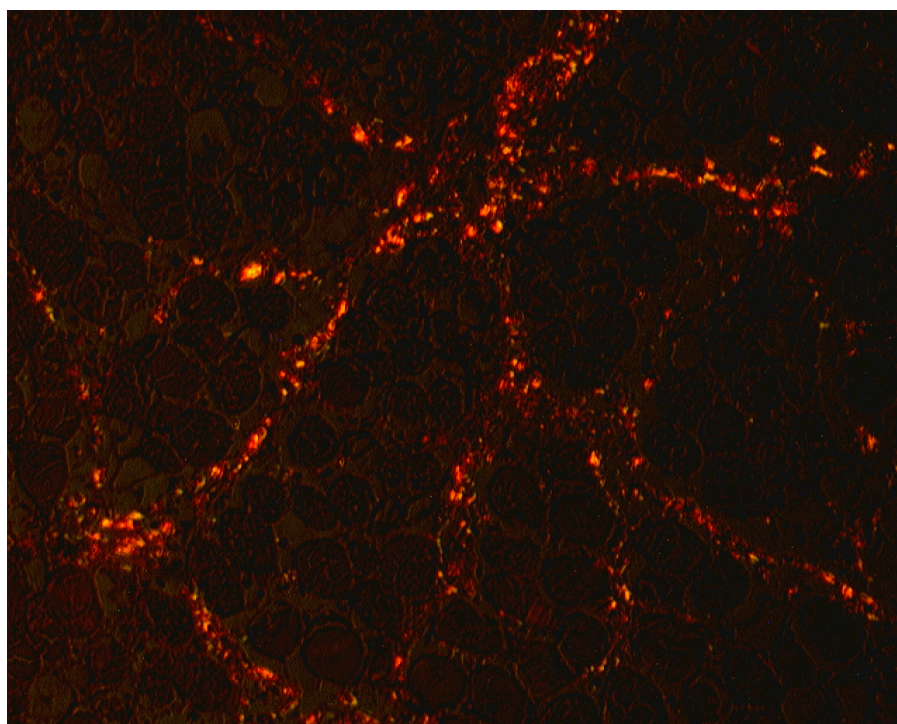


Figura 4: Lâmina corada com *Picrosirius Red*, vista em microscopia polarizada, destacando, a partir da birrefringência, as fibras colágenas

3.5.4 Imunohistoquímica

As análises Imunohistoquímicas foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular e Celular do Departamento de Biociências da UNIFESP. As secções musculares longitudinais foram desparafinadas em xilol e hidratadas em etanol, em seguida, pré-tratadas por microondas (Brastemp, SP, Brasil) com tampão 10 mM de ácido cítrico (pH 6) por 3 ciclos de 5 minutos cada em 850 W para o antígeno recuperação. As amostras foram pré-incubadas com peróxido de hidrogênio 0,3% em PBS por 5 min para inativação da peroxidase endógena,

e em seguida bloqueadas com soro de cabra normal de 5% em PBS por 10 min. Foram então incubadas com anti-VEGF e anti-COX-2 antibody (Santa Cruz Biotechnology, E.U.A.) na concentração de 1:400, a incubação foi realizada durante a noite a 4 ° C dentro do frigorífico. Esta foi seguida por duas lavagens em PBS por 10 min. Os cortes foram incubados com biotina conjugado anticorpo secundário anti-coelho IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, E.U.A.) na concentração de 1:200 em PBS por 1 h. Os cortes foram lavados duas vezes com PBS, seguida da aplicação de complexo pré-formado de avidina biotina conjugado com peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, E.U.A.) por 45 min. Os complexos vinculados foram visualizados através da aplicação de uma solução 0,05% de 3-3'-diaminobenzidina e contra-corados com hematoxilina de Harris. Para estudos de controle dos anticorpos, os cortes em série foram tratados com IgG coelho (Vector Laboratories, Burlingame, CA, E.U.A.) na concentração de 1:200 em lugar do anticorpo primário. Além disso, controles internos positivos foram realizados com cada lote de coloração.

3.5.5. Análise Estatística

Os dados foram avaliados utilizando-se ANOVA, seguido do post-hoc de Student-Newman - Keuls. O nível de significância estatística foi definido como $P < 0,05$. A avaliação estatística foi realizada através dos programas GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego CA, E.U.A.).

4. Resultados

4.1. Análise histopatológica

A figura 5 representa os achados histopatológicos dos grupos experimentais 6 dias após a cirurgia. Pode ser observado que os animais do grupo controle 6 dias (G1) apresentaram pouca quantidade de infiltrado inflamatório e extensa área de necrose, além do padrão descontínuo de fibras musculares. O grupo lesão tratado com LLLT na fluência $10\text{J}/\text{cm}^2$ (G2), apresentou de pouca a moderada área de necrose, alta concentração de infiltrado inflamatório e média organização tecidual. Já o grupo lesão tratado na fluência $50\text{J}/\text{cm}^2$ no mesmo período, 6 dias, apresentou pouca área de necrose, alta concentração de infiltrado inflamatório e boa organização tecidual.

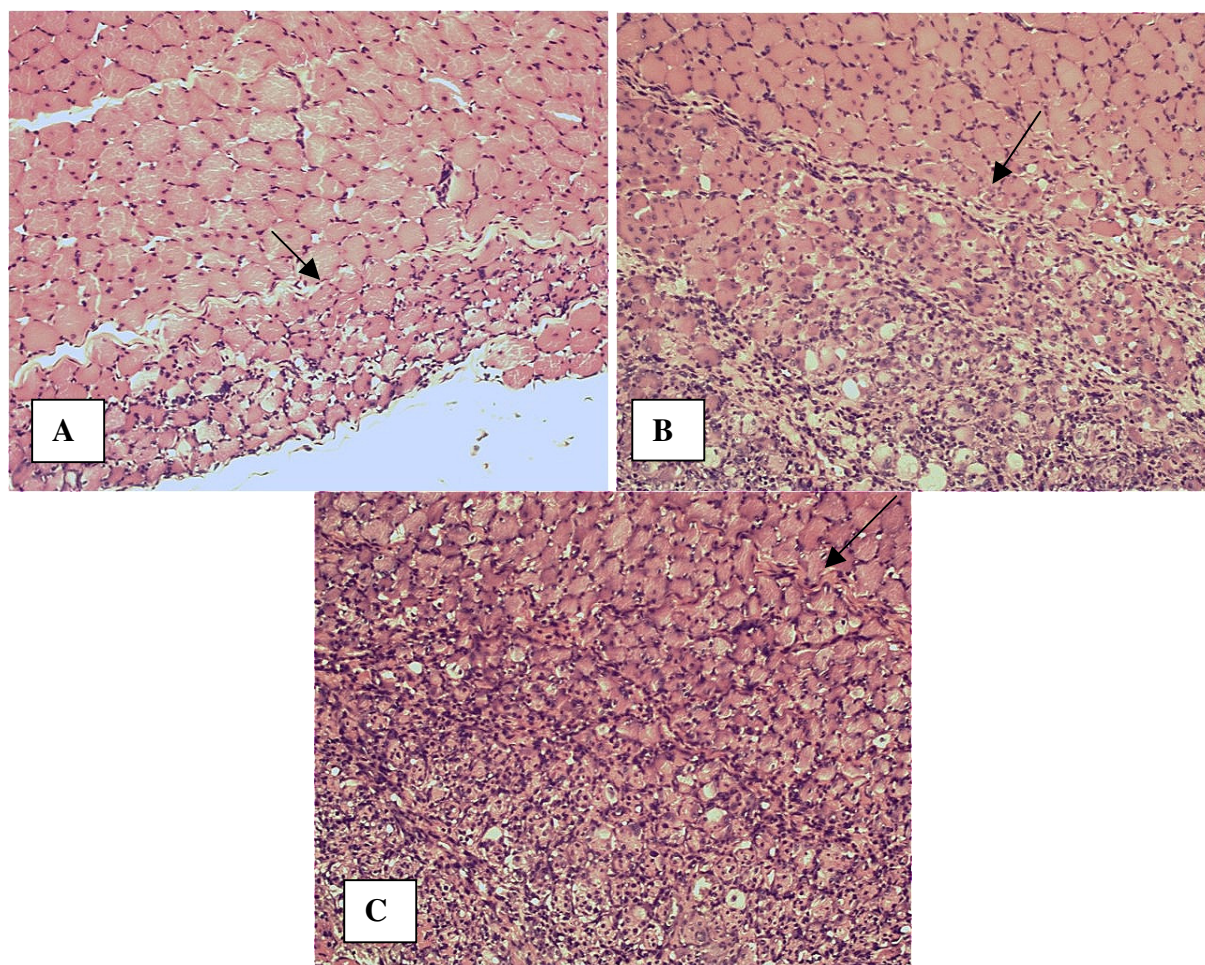


Figura 5: Fotomicrografias da lâminas coradas com HE em aumento 10x. **(A):** Grupo controle 6 dias (G1), pode ser observado a pequena quantidade de infiltrado celular, conforme indicado na figura. **(B):** Grupo irradiado na fluência $50\text{J}/\text{cm}^2$ por 6 dias (G3), apresentando média quantidade de infiltrado em comparação com o grupo controle (figura A). **(C):** Grupo irradiado na fluência $10\text{J}/\text{cm}^2$ por 6 dias (G2), mostrando maior concentração de infiltrado celular, em destaque pelas setas, quando comparada aos grupos controle (figura A) e os G3 (figura B).

A figura 6 representa os achados histopatológicos dos grupos experimentais 12 dias após a cirurgia. Pode ser observado nessa figura que os animais do grupo controle 12 dias (G4) apresentaram baixa concentração de infiltrado celular no local da lesão, e áreas multifocais de necrose, ainda assim, mostraram melhor organização tecidual em relação aos animais do grupo controle sacrificados após 6 dias da lesão (G1). Os animais do grupo tratado com LLLT na fluência $10\text{J}/\text{cm}^2$ por 12 dias (G5), apresentaram média quantidade de infiltrado inflamatório e pouca concentração de área de necrose. Os animais do grupo lesão tratado com LLLT na fluência $50\text{J}/\text{cm}^2$ (G6), mostraram pequena área de necrose, média concentração de infiltrado inflamatório e boa organização tecidual, apresentando ainda, melhor arquitetura tecidual em comparação ao grupo tratado por 6 dias na mesma fluência.

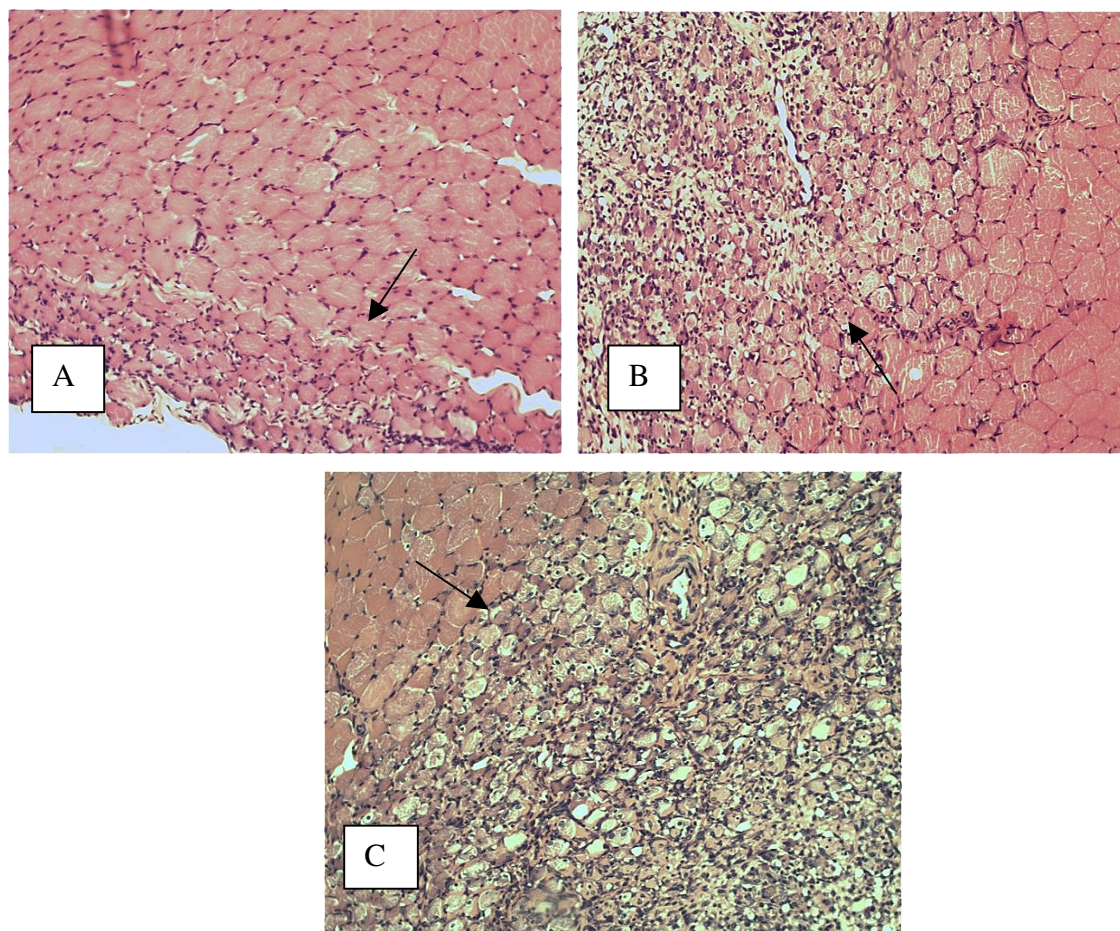


Figura 6: Fotomicrografias da lâminas coradas com HE em aumento 10x
(A): Grupo controle 12 dias (G4), em que pode ser observado pouca intensidade de infiltrado inflamatório, conforme demarcação. (B): Grupo irradiado na fluência $10\text{J}/\text{cm}^2$ por 12 dias (G5), apresentando média quantidade de infiltrado inflamatório em comparação com o grupo controle do mesmo período (figura A). (C): Grupo irradiado na fluência $50\text{J}/\text{cm}^2$ por 12 dias (G6), evidenciando alta concentração de infiltrado inflamatório quando comparado aos grupos G4 e G5 (figura A e B), conforme indicado na figura.

Análise semi quantitativa

A figura 7 apresenta os dados obtidos na análise semi-quantitativa de acordo com a classificação de Acikel (2005) e Bertinchant (2000).

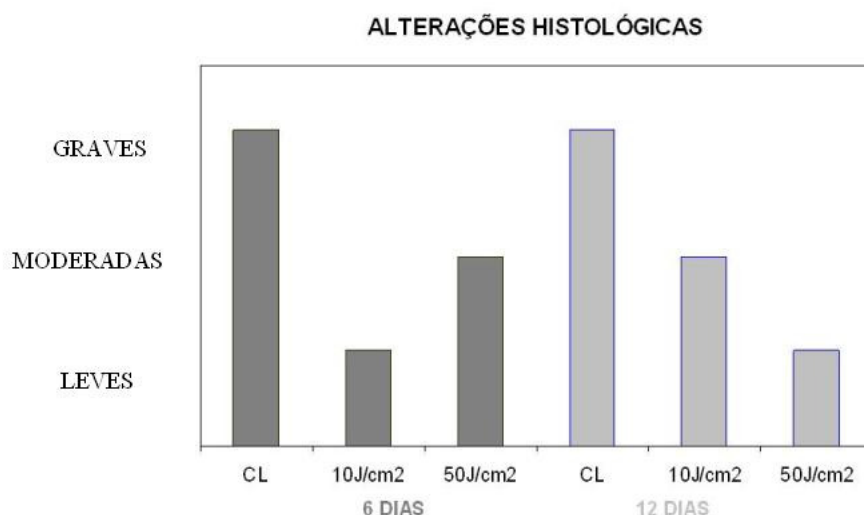


Figura 7: Análise semi-quantitativa das alterações histológicas

Devido a pouca quantidade de infiltrado celular e extensa área de necrose apresentada, os grupos controles 6 e 12 dias (G1 e G4), foram classificados como alterações graves (+++)

Comparando-se os grupos sacrificados no 6º dia pós lesão, o grupo tratado na fluência 10J/cm² (G2) apresentou alterações leves (+) em relação ao grupo tratado na fluência 50J/cm² (G3), este último classificado em alterações moderadas (++)

Os resultados obtidos nos grupos que sofreram sacrifício ao 12º dia após a lesão apresentam alterações moderadas (++) no grupo tratado na fluência 10J/cm² (G5), e alterações leves (+) no grupo tratado na fluência 50J/cm² (G6). Essa diferença foi dada devido a maior quantidade de infiltrado celular e melhor organização tecidual encontradas no grupo tratado na fluência 50J/cm² (G6).

Os grupos que obtiveram o melhor desempenho na análise morfológica estabelecida foram: o grupo lesado e tratado com LLLT na fluência 50J/cm² por 12 dias (G6) e o grupo lesado e tratado com LLLT na fluência 10J por 6 dias (G2).

4.2. Análise de fibras de colágeno

A figura 8 apresenta os resultados da análise quantitativa das fibras de colágeno, realizado através do software ImageJ, como descrito anteriormente.

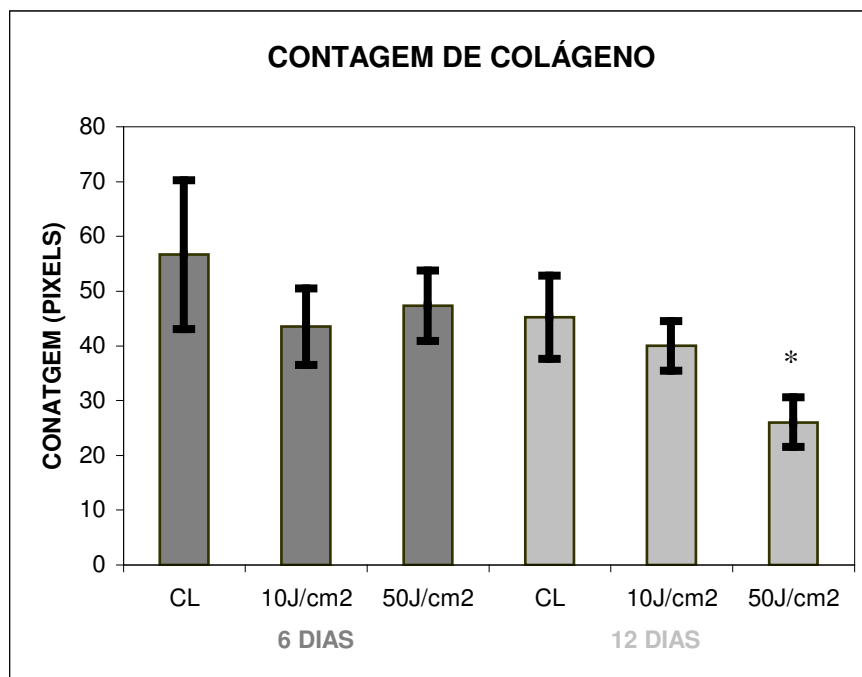


Figura 8: Contagem das fibras colágenas.

Pode ser observado na figura 8, que não houve diferença estatisticamente significativa na análise do colágeno entre os grupos tratados e o grupo controle no primeiro período experimental (6 dias) avaliado nesse estudo. Além disso, a figura 8 também evidencia que os animais do grupo irradiados com laser 50 J/cm² apresentou um valor estatisticamente menor quando comparado com os outros grupos no segundo período avaliado, como destacado na figura. Nenhuma outra diferença foi observada.

4.6 Imunohistoquímica

COX-2

6 dias

A expressão de COX-2 fora detectada predominantemente no citoplasma das células inflamatórias bem como nas células musculares. Seis dias após a lesão muscular, os resultados demonstraram moderada expressão desse imunomarcador no grupo controle (Figura 10A). No grupo tratado com laser na fluência 10J/cm² um padrão semelhante fora

observado (Figura 10B). Entretanto, intensa imunopositividade foi verificada no grupo tratado com laser na fluência de 50 J/cm^2 (Figura 10C).

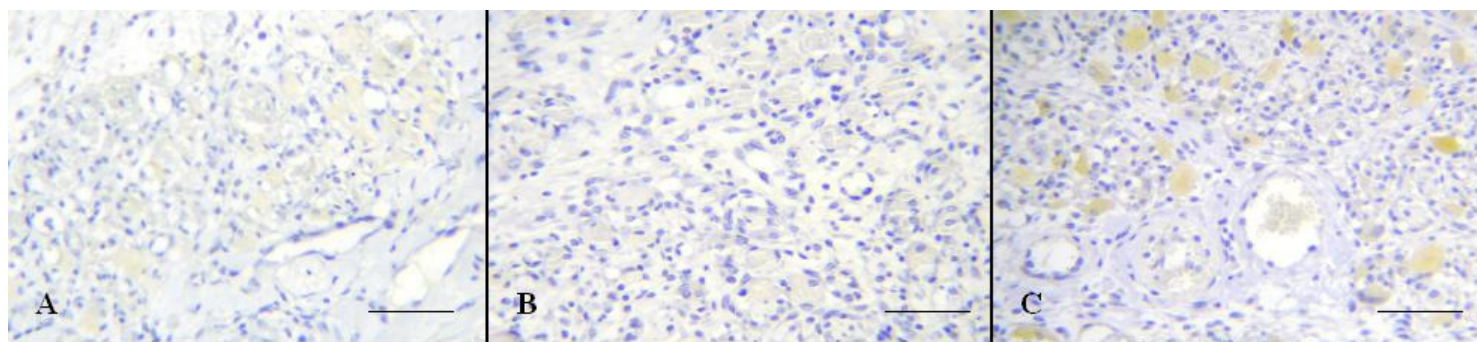


Figura 7:Imunohistoquímica para COX-2 seguindo seis dias após a lesão muscular em ratos. (A) grupo controle; (B) grupo laser 10 J/cm^2 e (C) grupo laser 50 J/cm^2 . (Coloração para imunohistoquímica, barra = $36 \mu\text{m}$).

12 dias

No período de 12 dias, a expressão de COX-2 fora detectada em todos os grupos indistintamente, ou seja, independente da fluência de laser utilizada nesse estudo. Tais resultados estão demonstrados na Figura 11.

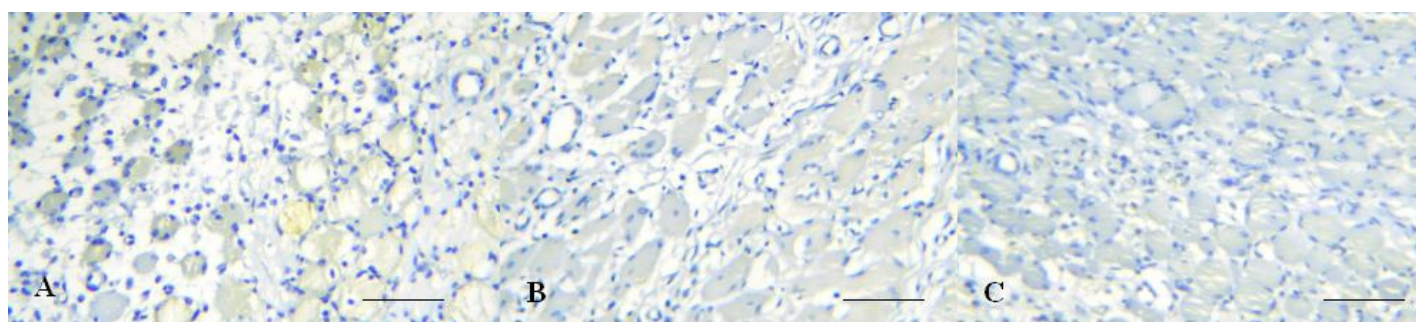


Figura 8: Imunohistoquímica para COX-2 seguindo doze dias após a lesão muscular em ratos. (A) grupo controle; (B) grupo laser 10 J/cm^2 e (C) grupo laser 50 J/cm^2 . (Coloração para imunohistoquímica, barra = $36 \mu\text{m}$).

VEGF

6 dias

A expressão de VEGF foi detectada nas células endoteliais dos capilares neoformados. Seis dias após a lesão muscular, os resultados demonstraram que a terapia laser não foi capaz de induzir a expressão diferencial desse imunomarcador, tanto na fluência de 10 J/cm² (Figura 11B) quanto na fluência de 50 J/cm² (Figura 11C).

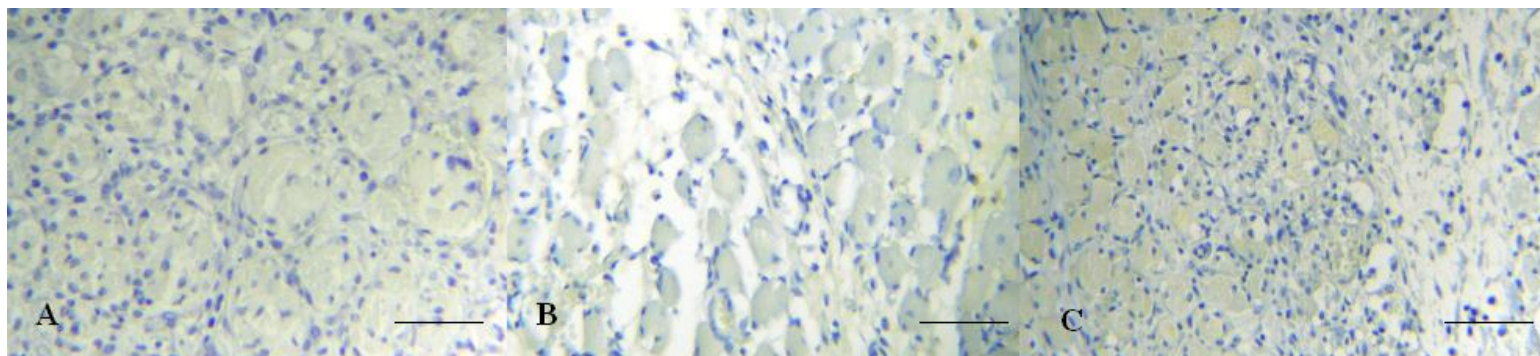


Figura 9. Imunohistoquímica para VEGF seguindo seis dias após a lesão muscular em ratos. (A) grupo controle; (B) grupo laser 10 J/cm² e (C) grupo laser 50 J/cm². (Coloração para imunoistoquímica, barra = 36 μm).

12 dias

Para esse período, o mesmo padrão ocorreu, ou seja, baixa imunoexpressividade foi detectada em todos os grupos. Tais resultados estão demonstrados na Figura 12.

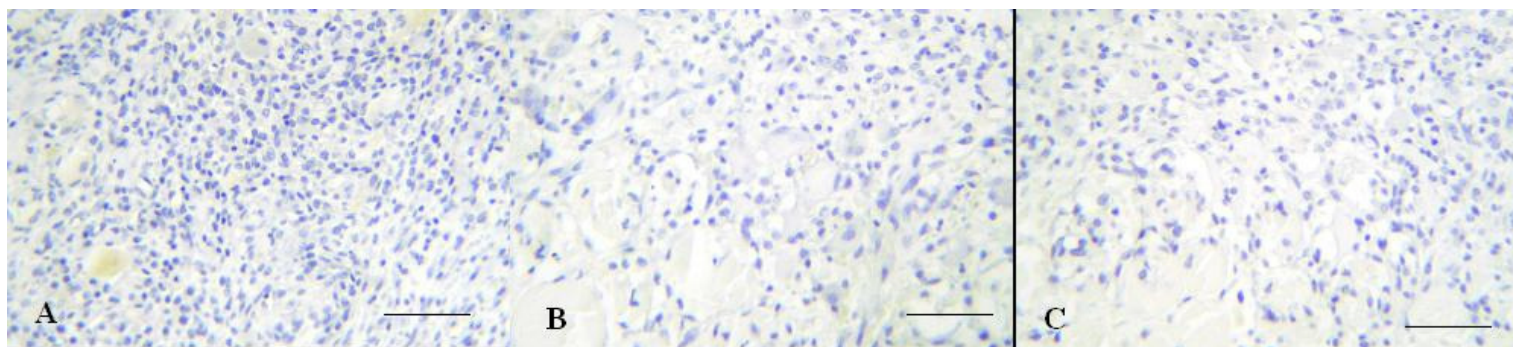


Figura 10. Imunohistoquímica para VEGF seguindo doze dias após a lesão muscular em ratos. (A) grupo controle; (B) grupo laser 10 J/cm² e (C) grupo laser 50 J/cm². (Coloração para imunoistoquímica, barra = 36 μm).

5. Discussão

As lesões musculares são caracterizadas principalmente pela degeneração da fibra muscular, ruptura de mitocôndrias e retículo sarcoplasmático, interrupção da continuidade do sarcolema e necrose celular (TIDBALL, 1995). Esses comprometimentos levam à redução da funcionalidade e rendimento para o treino, principalmente no caso de atletas, e ainda pode resultar em aumento do risco a recorrência de novas lesões (VERRAL et al.2001; ORCHARD e BEST, 2002).

Para possibilitar que o paciente volte a realizar suas atividades o mais precocemente possível muitos recursos terapêuticos têm sido pesquisados, com o objetivo de se reduzir os efeitos da resposta inflamatória aguda e acelerar a recuperação (FISHER et al., 2000). Entre esses tratamentos podemos citar o laser terapêutico.

De acordo com os resultados deste trabalho, pode-se sugerir que a terapia laser foi eficaz no processo de reparo muscular, tanto na fluência 10 quanto na fluência 50J/cm², uma vez que os animais dos grupos tratados apresentaram uma menor área de necrose, uma maior concentração de infiltrado celular e maior integridade das fibras musculares quando comparadas ao grupo controle lesão.

Cada lâmina foi avaliada qualitativamente segundo a presença de critérios histopatológicos, como presença de infiltrado celular, região necrótica e integridade da fibra muscular. Ao analisarmos as amostras do grupo controle lesão, constatamos que o método da criolesão mostrou-se eficaz na promoção de lesão muscular, sendo observadas alterações na arquitetura muscular bem como regiões de aparência amorfa, correspondentes às áreas de necrose por coagulação, seguindo um padrão descontínuo de fibras musculares.

O processo inflamatório também se mostrou presente nos grupos lesados tratados com laser. Pode ser observado que 6 dias após a lesão, os grupos tratados apresentaram grande quantidade de infiltrado, sugerindo que esse recurso seria eficaz em realizar um recrutamento precoce de células inflamatórias e de reparo, com a aceleração do processo de resolução.

Os animais que não receberam nenhum tipo de tratamento apresentaram menor intensidade do processo inflamatório, além de maiores áreas de necrose e desorganização tecidual. Já os animais tratados na fluência 10 e 50J/cm² apresentaram moderada área de necrose. Estes achados corroboram com os resultados encontrados por outros autores. Roxanna et al (2007) demonstraram que o laser AsGa, nas fluências de 0,8 e 2,5 J/cm², promoveram um aumento da área das fibras no músculo gastrocnêmio lesado quando

comparado ao grupo controle. Ainda, Amaral et al. (2001), avaliando os efeitos de diferentes fluências (2.6, 8.4 e 25 J/cm²) do laser HeNe (632.8 nm), na regeneração do tecido muscular, concluíram que o efeito do laser na regeneração muscular foi dose-específica, sendo que apenas os grupos irradiados com a dose de 2.6J/cm², apresentaram aumento da área de fibra muscular e a densidade de mitocôndrias. Luz et al. (2007), também encontraram um estado mais avançado de regeneração muscular após o tratamento com o laser As-Ga-Al, 10J/cm². Verificou-se que o laser determinou melhor distribuição do colágeno entre as fibras musculares no 8º dia após a lesão, concluindo-se que esse recurso contribuiu na fase mais tardia da reparação da lesão, melhorando o rearranjo arquitetural das fibras e disposição de colágeno. De acordo com esses estudos, o LLLT é capaz de acelerar a resolução do processo inflamatório no tecido muscular e diminuir o tempo de regeneração tecidual (BJORDAL ET AL, 2006). Cressoni et. al. (2008) demonstraram diminuição do número de leucócitos do infiltrado inflamatório encontrado no local da lesão, após aplicação de laser Al Ga As (785 nm) na fluência 9J/cm².

Ainda, este trabalho verificou que não houve diferença na quantidade de fibras colágenas no primeiro período experimental avaliado entre nenhum dos grupos. No último período avaliado, foi observado uma diminuição da quantidade de colágeno dos animais irradiados com laser 50 J/cm² quando comparado com o grupo tratado na dose de 10 J/cm² e do grupo controle.

A deposição de fibras colágenas também pode ser considerada um indicativo de processo cicatricial após a lesão muscular. Durante esse processo, o tecido de granulação é enriquecido com fibras colágenas, o que confere resistência à cicatriz, associada a organização com a qual essas fibras foram depositadas. O processo completo é composto pelas fases sucessivas de produção, digestão e orientação das fibras colágenas (RISPOLI, 2006). O colágeno é necessário para o processo regenerativo, porém, quando há degeneração de uma extensa área muscular, a proliferação de fibroblastos neste local pode levar à formação excessiva de cicatrizes (fibras colágenas interligadas por pontes cruzadas) que bloqueiam o movimento realizado por aquele músculo (LETHO, 1985).

Devido a essa resistência imposta pelas fibras colágenas no processo cicatricial, podemos sugerir que a curto prazo, a presença de fibras colágenas na área da lesão indique processo de regeneração. Porém, a longo prazo, essas fibras colágenas gerariam aderência e fibrose, limitando a funcionalidade muscular já alterada. Resultados semelhantes foram também descritos na literatura, Baptista et al (2000) em estudo com grupo controle intacto, grupo lesão sem tratamento e grupo tratado, avaliados no 1º, 7º, 14º e 21º dia pós lesão,

utilizando laser AlGaAs, 660 nm, na fluência $5\text{J}/\text{cm}^2$ por 10 s, observaram que houve aumento da deposição de fibras colágenas apenas nos 7 primeiros dias, e o tecido só alcançou o mesmo estado de organização que o grupo controle intacto após 21 dias.

Miller et al. (2001) analisaram as alterações no músculo sóleo de ratos, até 28 dias após o procedimento cirúrgico, e observaram a diminuição da quantidade de fibras colágenas com 14 e 28 dias, quando comparado ao grupo controle, apresentando resultado semelhante ao que encontramos nesse estudo.

Em contrapartida, estudos já citados de Ribeiro et. al. (2009) em que após a aplicação de laser de baixa potência, e avaliação da resposta inflamatória e deposição de fibras colágenas, foi visto que houve maior estímulo da sua produção na fase final de cicatrização, aos 14 dias após a lesão.

Levando em consideração que alguns mediadores inflamatórios, como prostaglandinas e produtos do ácido araquidônico desempenham um papel importante durante a reparação tecidual, é essencial avaliar a expressão da ciclo-oxigenase-2 durante o processo de reparo muscular. Ciclo-oxigenase é uma enzima fundamental na conversão do ácido araquidônico para prostanóides. A expressão da isoforma ciclo-oxigenase-2 é importante para muitos processos patológicos, incluindo a inflamação, reparação tecidual e, finalmente, para a carcinogênese (SHIBATA et al., 2005).

Quando a expressividade da ciclo-oxigenase-2 foi investigada, nossos resultados demonstraram que as terapias a laser na fluência de $50\text{J}/\text{cm}^2$, principalmente no primeiro intervalo de tempo estudado, promoveu uma maior expressão deste mediador inflamatório, o que se torna compatível com um estágio mais avançado de reparo. Nossos resultados também estão de acordo com aqueles obtidos por Herman e Khosla (1989), que analisaram o efeito terapêutico de Ga-Al-As na inflamação usando $2,3\text{ J}/\text{cm}^2$. Outros ainda têm demonstrado que a terapia a laser (Ga-Al-As) exerce uma ação anti-inflamatória tempo-dependente a uma densidade de energia de $2,5\text{ J}/\text{cm}^2$ com apenas uma única aplicação (AIMBIRE et al., 2008). Em conjunto, estes resultados demonstram que tanto a terapia laser melhoram o reparo do músculo, como resultado da modulação da expressão da COX-2 após a indução de lesão muscular em ratos principalmente na maior dose utilizada e nos períodos mais iniciais de reparo.

Alem disso, pode ser observado que a terapia laser neste estudo, não foi eficaz na modulação do VEGF em nenhuma das doses utilizadas.

Assim que ocorre a lesão, há uma concentração de componentes de sangue no local e posteriormente, ocorre a proliferação de componentes vasculares, que melhoram o aporte

sanguíneo de extrema importância para recuperação de tecidos lesados. Além disso, imediatamente após a lesão muscular, essa área sofre lesão isquêmica e há falta de nutrientes e O₂, que são repostos pela angiogênese. Dessa forma, uma perfusão sanguínea é essencial para o processo de cicatrização (ENWEMEKA et al, 1989).

A metodologia empregada neste trabalho pode ser considerada adequada para alcançar os objetivos propostos. O procedimento de lesão muscular escolhido, a criolesão (WERNING et al, 1991), foi previamente testado em nosso laboratório, e escolhido por produzir uma área similar de lesão muscular primária na região superficial do ventre dos músculos de ratos (OLIVEIRA et al, 2006).

Além disso, o protocolo de tratamento escolhido foi iniciado 24 horas após a lesão, na tentativa de maximizar os efeitos potenciais do tratamento na regeneração e potencializar a ação dos macrófagos, levando a aceleração da resposta de fatores de crescimento, e conseqüentemente aumentando a proliferação de células satélites (MERLY, 1999). Além disso, a aplicação das terapias foi feita a cada 48, no intuito de reservar um dia de “descanso” para o tecido, bem como, simular a rotina dos tratamentos clínicos convencionais.

6. Conclusão

No presente estudo, pode-se constatar a eficácia da terapia laser nas fluências 10 e 50J/cm² no processo de reparação muscular após criolesão. Nos animais tratados houve diminuição da área de necrose, maior concentração de infiltrado celular, melhor organização das fibras e diminuição da deposição de fibras colágenas (12 dias após a cirurgia). Ainda, observou-se uma maior expressão de COX2.

Todavia, ainda são necessários maiores estudos neste campo para que se possa estabelecer os parâmetros mais adequados na utilização da terapia laser de baixa potência.

7. Referências bibliográficas

- ACIKEL, M. et al. **Protective effects of dantrolene against myocardial injury induced by isoproterenol in rats: biochemical and histological findings.** Int. J. Cardiol., v.98, p.389–394, 2005.
- AMARAL, A.C.; SALVINI, T. **Dose-dependency of low energy HeNe lab effect in regeneration on skeletal muscle in mice.** Lasers Med Sci , 16: 44-51, 2001.
- AIMBIERE, F. et al. **Low level laser therapy (LLLT) decreases pulmonary microvascular leakage, neutrophil influx and IL-1beta levels in airway and lung from rat subjected to LPSinduced inflammation.** Inflammation., v. 31, p.189-97, 2008.
- BAPTISTA, J. et al. **Influence of laser photobiomodulation on collagen IV during skeletal muscle tissue remodeling after injury in rats.** Photomed Laser Surg. Aug 11, 2010
- BASFORD, J.R. **Low-energy laser therapy: controversies and new research findings.** Lasers Surg. Med., 9: 1-5, 1989.
- BAXTER, G.D. **Therapeutic lasers: theory and practice.** Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994.
- BERTINCHANT, T.J. et al. **Comparison of the diagnostic value of cardiac troponin I and T determinations for detecting early myocardial damage and the relationship with histological findings after isoprenaline-induced cardiac injury in rats.** Clinica Chimica Acta, v. 298, p. 13-28, 2000.
- BJORDAL, J.M.; MARTINS, R.A.L.; IVERSEN, V.V. **A randomised, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin e2 concentrations.** Br. J. Sports Med., v.40, p.76–80, 2006.
- CARLSON, B.M.; FAULKNER, J.A. **The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review.** Med. Sci. Sports Exerc., 15: 187-198, 1983.
- CRESSONI, M.D. et al. **The Effects of a 785-nm AlGaInP Laser on the Regeneration of Rat Anterior Tibialis Muscle After Surgically-Induced Injury.** Photomed Laser Surg. 2008.
- ENWEMEKA, C.S. **Inflammation, cellularity, and fibrillogenesis in regenerating tendon: implications for tendon rehabilitation.** Phys Ther. Oct;69(10):816-25, 1989.
- FISHER. B.D. et al. **Ultrastructural events following acute muscle trauma.** Med. Sci. Sports Exerc., 22: 185-193, 1990.
- FISHER, B.D. et al. **The effects of low power laser therapy on muscle healing following acute blunt trauma.** J. Phys. Ther. Sci., v.12, p. 49–55, 2000.

HADJIRGYROU M. et. al. **Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound.** Clin. Orthop. Relat. Res., 355: 216-29, 1998.

HERMAN, J.H.; KHOSLA, R.C. **Nd:YAG laser modulation of synovial tissue metabolism.** Clin Exp Rheumatol., v.7, p.505-12, 1989.

HORTOBÁGYI, T. et al. **Changes in muscle strength, muscle fiber size and myofibrillar gene expression after immobilization and retraining in humans.** J. Physiol. 524: 293-304, 2000.

HURME, T.; KALIMO, H. **Activation of myogenic precursor cells after muscle injury.** Med. Sci. Sports Exerc., 24: 197-205, 1992.

HURME, T. et al. **Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study.** Med. Sci. Sports Exerc., 23: 801-810, 1991.

IYOMASA, D.M. et al. **Ultrastructural analysis of the low level laser therapy effects on the lesioned anterior tibial muscle in the Gerbil.** Micron 40 (2009) 413–418

KARU, T.I. **The science of low-power laser therapy.** Amsterdam: Copyringht, 1998.

KITCHEN, S.S.; PARTRIDGE, C.J. **A review of low level laser therapy.** Physiotherapy, 77: 161-168, 1991.

KNIGHT, K.L. **Cryotherapy in sports injury management.** Indiana: Human Kinetics, 1995.

LETHO, M; DUANCE, VC; RESTALL D. **Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury.** The Journal of bone and joint sugery. V 67; 5; 1985.

LUZ, M.M.A. et al. **Efeito do laser As-Ga-Al de baixa potencia sobre o músculo gastrocnêmio de rato submetido à lesão mecânica.** Rev. Eletron. Farmácia, v.4: p.159-168, 2007.

MERLY, F. et al. **Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation.** Muscle Nerve, v.22: p.724-32, 1999.

MILLER, T.A. et al. **Hindlimb unloading induces a collagen isoform shift in the soleus muscle of the rat.** Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 281: R1710–R1717, 2001.

MIYABARA, E.H.; Aoki, M.S.; Moriscot, A.S. **Cyclosporin A preferentially attenuates skeletal slow-twitch muscle regeneration.** Braz. J. Med. Biol. Res., 38: 559-563, 2005.

OLIVEIRA, M.N.L.; Rainero, P.E.; Salvine, T.F. **Tree intermittent sessions of cryotherapy reduce the secondary injury in skeletal muscle of rats.** Journal of sports Science and Medicine v.5, 228-234, 2006.

ORCHARD, J.; BEST, T. **The management of muscle strain injuries: an early return versus the risk of recurrence.** Clinical J. Sports Med., 12: 3-5, 2002.

ORTIZ, M.C.S. et al. **Laser de baixa intensidade, princípios e generalidades - parte1.** Fisioter. Bras., 2: 221-240, 2001.

OZAWA, Y. et al. **Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells.** Bone, 22: 347-354, 1998.

PRENTICE, W.E. **Modalidades terapêuticas em medicina esportiva.** São Paulo: Manole, 2002.

RANTANEN, J. et al. **Effects of Therapeutic Ultrasound on the Regeneration of Skeletal Myofibers After Experimental Muscle Injury.** Am. J. Sports Med., 27: 54-59, 1999.

RIBEIRO, G.M.A. et al. **Morphological analysis of second-intention wound healing in rats submitted to 16 J/cm² lambda 660-nm laser irradiation.** Indian J Dent Res. Jul-Sep;20(3):390, 2009

RISPOLI, D.Z. **Corticóide intracordal: efeito na cicatrização da prega vocal após exérese de fragmento de mucosa com laser de CO₂ em suínos.** Curitiba, 2006.

RIGAU, J. **Acción de la luz láser a baja intensidad en la modulación de la función celular.** [Tese]- facultad de Medicina i Ciencia de la Salut, Univ. Rovira i Virgili; 1996.

RILEY, D.A. et al. **Review of spaceflight and hindlimb suspension unloading induced sarcomere damage and repair.** Basic. Appl. Myol. 5: 139-145, 1995.

ROXANA, P.L.; Vargas, F.M.; Mella, H.S. **Efecto Morfológico de la Irradiación Láser AsGa en el Músculo Esquelético de Rata.** Int. J. Morphol., 25: 43-50, 2007.

SENE, G.L. **Influência do laser de baixa intensidade nas propriedades mecânicas do músculo tibial anterior submetido à lesão muscular por mecanismo de impacto.** Dissertação para Programa de Pós-Graduação, Interunidades de Engenharia, 2005.

SILVEIRA, P.C.L. et al. **Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy.** Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 95 (2009) 89–92

SHIBATA, M. et al. **Cyclo-oxygenase-1 and -2 expression in human oral mucosa, dysplasias and squamous cell carcinomas and their pathological significance.** Oral Oncol., v.41, p.304-12, 2005.

TIDBALL, J.G. **Inflammatory cell response to acute muscle injury.** Med. Sci. Sports Exerc., 27: 1022-1032, 1995.

TOMA, R.L. et al. **Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade e do laser terapêutico de baixa potência na regeneração muscular no músculo tibial anterior após a criolesão em ratos.** Unpublished Data, 2008.

WEISS, N.; ORON, U. **Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation.** Anat. Embriol., 186: 497-503, 1992.

WERNING, A.; SALVINI, T.F.; IRINTCHEV, A. **Axonal sprouting and changes in fibre types after running-induced muscle damage.** J Neurocytol., 20: 903-913, 1991.

YAAKOBI, T.; MALTZ, L.; ORON, U. **Promotion of bone repair in the cortical bone of the tibia in rats by low energy laser (He-Ne) irradiation.** Calcif. Tissue Int., 59: 297–300, 1996.

YOUNG, S. et al. **Macrophage responsiveness to light therapy.** Laser Surg. Med., 9: 497-505, 1989.

VERRAL, G.M. et al. **Clinical risk factors for hamstring muscle strain injury: a prospective study with correlation of injury by magnetic resonance imaging.** Br. J. Sports. Med., 35: 435-439, 2001.